



DS

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : A61K 37/02, 47/36		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/10456 (43) Date de publication internationale: 20 septembre 1990 (20.09.90)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00164</p> <p>(22) Date de dépôt international: 9 mars 1990 (09.03.90)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 89/03086 9 mars 1989 (09.03.89)</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES [FR/FR]; Université Paris-Nord, Avenue J.B.-Clément, F-93430 Villetaneuse (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BARRITAULT, Denis [FR/FR]; 4, rue Française, F-75001 Paris (FR). JOZEFONVICZ, Jacqueline [FR/FR]; 62, Deuxième Avenue, F-60260 Lamorlaye (FR). SLAOUI, Faouzi [MA/FR]; 77, rue de Rome, F-75017 Paris (FR). TARDIEU, Michèle [FR/FR]; 14, impasse Diderot, F-94500 Champs-sur-Marne (FR). CARUELLE, Jean-Pierre [FR/FR]; 32, rue Jules-Joffrin, F-94100 Saint-Maur (FR). COURTY, José [FR/FR]; 15, allée Verte, F-94440 Villecresnes (FR).</p>		FR	<p>(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BB, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BG, BJ (brevet OAPI), CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LK, LU (brevet européen), MC, MG, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), MW, NL (brevet européen), NO, RO, SD, SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), SU, TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.</p>
<p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>			

(54) Title: FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF)-BASED STABILIZED COMPOSITIONS

(54) Titre: COMPOSITIONS STABILISEES A BASE DE FGF

(57) Abstract

Agents having a cellular and tissular regenerating activity consisting of functionalized substituted dextrans, stabilized compositions containing said agents associated with at least one fibroblast growth factor (FGFs) such as a FGF acid and/or a basic FGF and/or a derivative and/or an analogue and/or a fragment of these disclosing a biological activity and their *in vitro* applications such as storing FGFs and cellular cultures and *in vivo* applications as a therapeutic agent, in particular for healing and tissular regeneration or as a cosmetic agent.

(57) Abrégé

Agents à activité régénératrice cellulaire et tissulaire constitués par des dextrans substitués fonctionnalisés, compositions stabilisées contenant lesdits agents associés à au moins un facteur de croissance des fibroblastes (FGFs) tels qu'un FGF acide et/ou un FGF basique et/ou un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique et leurs applications *in vitro* telles que stockage des FGFs et cultures cellulaires et *in vivo* comme agent thérapeutique, notamment pour la cicatrisation et la régénération tissulaire ou comme agent cosmétique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LJ	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

Compositions stabilisées à base de FGF.

5 La présente invention est relative à des agents à activité régénératrice cellulaire et tissulaire constitués par des dextranes, à des compositions stabilisées contenant lesdits agents associés à des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) ainsi qu'à leurs
10 applications *in vitro* telles que stockage des FGFs et cultures cellulaires et *in vivo* comme agent thérapeutique, notamment pour la cicatrisation et la régénération tissulaire ou comme agent cosmétique.

15 Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) ont été mis en évidence par de nombreuses équipes, à la suite des études des activités biologiques des facteurs de croissance, obtenus à partir d'extraits d'un très grand nombre de tissus ou d'organes (cerveau, hypophyse, rétine, humeur vitrée, choroïde, iris, cartilage,
20 rein, foie, placenta, *corpus luteum*, prostate, os, muscle etc...)

25 La diversité même des tissus étudiés et des cellules stimulées par ces facteurs *in vitro* et *in vivo*, ainsi que le grand nombre d'équipes qui ont indépendamment contribué à la caractérisation, l'isolement et l'identification complète de ces facteurs, explique la multitude de noms et sigles donnés par ces différents auteurs pour les désigner.

30 Il apparaît que tous ces extraits contiennent des facteurs de croissance de la famille des FGFs et que cette famille peut être divisée en deux branches principales.

35 La première branche a été décrite sous les noms de FGF basique, de facteur basique de croissance des fibroblastes ou de type 2 affin pour l'héparine ou "Heparin Binding Growth Factor II" (HBGF II), de facteur de croissance dérivé du cerveau ou Brain-Derived Growth

Factor (BDGF), de facteur de croissance dérivé de l'oeil ou Eye-Derived Growth Factor II (EDGF II), de facteur de croissance des astrocytes II ou AGF II, de facteur de croissance dérivé du cartilage (CDGF) etc... alors que la 5 deuxième branche de la famille FGF a été décrite sous les noms de FGF acide ou facteur affin pour l'héparine de type I (HBGF I), facteur dérivé du cerveau ou BDGF I, etc...

Ces facteurs ont été nommés soit selon le type 10 de cellules cibles utilisées (facteurs de croissance des fibroblastes, astrocytes ou cellules endothéliales avec les sigles FGF, AGF, ECGF), soit selon la source à partir de laquelle ce facteur est extrait (exemple : facteur de croissance dérivé du cerveau, dérivé de la rétine ou des 15 yeux, du cartilage, d'hépatocytes en culture avec respectivement les sigles BDGF, RDGF, EDGF, CDGF, HDGF...), soit encore selon une propriété biochimique ou biologique (facteurs de croissance affins pour l'héparine (HBGF) ou facteur tumoral angiogénique (TAF) ; les deux 20 principales branches de la famille sont nommées selon ces sigles, précédés ou suivis de acide ou basique, ou type I ou type II.

C'est en suivant l'activité biologique sur des 25 cellules en culture que ces facteurs ont pu être purifiés. Les premières caractéristiques physicochimiques (poids moléculaire et point isoélectrique) ont été publiées dès 1975 (GOSPODAROWICZ, J. Biol. Chem. 250, 2515) pour la forme basique et en 1982 (BARRITAULT et al., J. Neurosci. 8, 477-490) pour la forme acide.

30 La purification à homogénéité des deux formes du FGF a permis d'établir leurs structures primaires (ESCH. et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 82, 6507 pour la forme basique et GIMENEZ G. et al., 1985, Science, 230, 1385-1388 pour la forme acide).

35 L'isolement des deux formes a été grandement favorisée par la mise en évidence d'une forte affinité de

ces facteurs pour l'héparine et l'utilisation subséquente d'une chromatographie d'affinité sur héparine immobilisée (SHING et al., 1984, *Science*, 223, 1296-1299).

Il est connu que, *in vitro*, les FGFs sont capables de stimuler la prolifération et la différenciation d'un grand nombre de cellules provenant de tissus et d'espèces différents.

On peut citer notamment les cellules fibroblastiques, endothéliales, épithéliales, les kératinoctyes, chondrocytes, myoblastes, astrocytes etc..., ainsi que la survie neuronale.

Il est également connu que, *in vivo*, les FGFs présentent des propriétés neurotrophiques, angiogéniques et cicatrisantes.

On peut citer notamment le Brevet français 79 18282, qui enseigne un procédé de stimulation de la croissance des cellules épidermiques ; ce procédé montre en particulier le rôle d'un extrait aqueux de rétine partiellement purifié et contenant du FGF sur la stimulation desdites cellules épidermiques.

On connaît également le Brevet américain 4 477 435, qui enseigne une méthode de cicatrisation de l'épithélium cornéen à l'aide d'une composition contenant un extrait aqueux de rétine.

On connaît également de nombreux travaux concernant la mise en évidence et la caractérisation des FGFs et leur rôle dans la régénération et la cicatrisation de la peau, des vaisseaux, des nerfs, des os, des muscles etc... tant *in vitro* qu'*in vivo*.

On peut citer en particulier le Brevet américain 4 444 760, qui décrit un facteur de croissance acide dérivé du cerveau, son procédé d'extraction et son application à la cicatrisation des plaies et la demande de Brevet européen 186 084 qui décrit une méthode de stimulation de la croissance des cellules endothéliales vasculaires à l'aide d'une composition contenant le facteur

de croissance acide dérivé du cerveau décrit précédem-
ment.

Les FGFs décrits ci-dessus sont obtenus par
purification ; on connaît par ailleurs, par la Demande
5 internationale PCT US86/01879, des FGFs obtenus par
recombinaison génétique.

Une autre composition cicatrisante à base d'au
moins un FGF est décrite dans la Demande de Brevet euro-
péen 243 179 et comprend en outre du collagène et de
10 l'héparine et/ou un glycoaminoglycane.

Dans ces différents documents, l'application
topique du FGF, seul ou associé, est réalisée à l'aide de
formulations usuelles telles que crèmes, pâtes, solu-
tions, gels ou associées à des polymères, des éponges et
15 des pompes permettant un relargage lent des FGFs, comme
cela est en particulier décrit dans la demande Interna-
tionale PCT US86/01879, dans laquelle il est précisé que
des formulations comprenant des FGFs recombinants et des
excipients ou des molécules de transport appropriés peu-
20 vent être préparées, notamment des lotions, des gels, des
formes retard ou des crèmes, ledites formulations étant
éventuellement associées à d'autres principes actifs,
tels que des antibiotiques. Les formes retard, décrites
dans cette Demande, comprennent en particulier des poly-
25 mères.

Les compositions obtenues peuvent notamment
être utilisées comme cicatrisant, dans le contrôle de la
coagulation, dans l'amélioration des dommages neurolo-
giques et dans la régénération des tissus durs.

30 Il apparaît toutefois, que le FGF ne présente
pas systématiquement une stimulation de la cicatrisa-
tion ; en effet une absence de stimulation a été notam-
ment rapportée dans J. Dermatol. Sing. Oncol. ; de ce
fait, l'application topique de FGF acide ou basique doit
35 souvent être itérative, pour obtenir les effets maximaux,
bien que certaines compositions de l'Art antérieur telles

que des éponges d'alcoolpolyvinyle imbibées de FGFs, appliquées sous la peau, entraînent une prolifération fibroblastique et myoblastique.

Ceci est dû à une instabilité thermique de la molécule, à une inactivation de la molécule liée au pH, à une protéolyse par des enzymes, ainsi qu'à une interaction entre les FGFs et les glycoaminoglycans comme l'héparane sulfate ou le protéohéparane sulfate des membranes cellulaires ou des membranes basales, entraînant une immobilisation des FGFs pouvant empêcher leur accès aux récepteurs cellulaires.

De tels inconvénients limitent les possibilités de stockage et d'exploitation des FGFs.

La Demande de Brevet européen 267 015 a proposé, pour pallier cet inconvénient, une composition contenant un facteur de croissance polypeptidique, plus particulièrement de l'EGF, et une quantité de polysaccharide soluble dans l'eau suffisante pour stabiliser ledit facteur contre la perte d'activité biologique, en présence d'eau notamment. Il est spécifié dans cette Demande, que les polysaccharides solubles dans l'eau qui peuvent être utilisés incluent les dérivés de la cellulose, l'amidon, l'agar, l'acide alginique, la gomme arabeique, les dextrans, les fructanes, l'inuline, les mannanes, les xylanes, les arabinannes, les chitosanes, le glycogène et les glucanes.

Les Inventeurs, poursuivant leurs travaux sur les dextrans, ont mis en évidence de nouvelles propriétés de dextrans substitués fonctionnalisés ; lesdits dextrans s'avèrent présenter une activité régénératrice cellulaire et tissulaire propre et présentent, de plus, non seulement une action stabilisante sur une composition de FGF mais coopèrent avec le FGF dans l'activité biologique de ce dernier.

La Demanderesse s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un agent à activité régénératrice

cellulaire et tissulaire ainsi qu'à des compositions contenant ledit agent associé à des FGFs qui répondent mieux aux nécessités de la pratique que les compositions visant au même but proposées dans l'Art antérieur, notamment en ce que les compositions conformes à l'invention ont une stabilité nettement améliorée, permettant un stockage plus aisé et de ce fait un effet thérapeutique supérieur aux compositions de l'Art antérieur et en ce que leur fréquence d'application est ainsi nettement diminuée.

La présente invention a pour objet un agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire, caractérisé en ce qu'il est constitué par au moins un dextrane substitué fonctionnalisé.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit agent, les dextrans substitués fonctionnalisés sont choisis dans le groupe qui comprend des dextrans solubles et des dextrans insolubles.

On entend par dextrans solubles substitués fonctionnalisés, ceux qui sont notamment décrits dans le Brevet français n° 2 555 589 ou dans le Brevet français n° 2 461 724.

On entend par dextrans insolubles substitués fonctionnalisés, ceux qui sont notamment décrits dans la Demande de Brevet français n° 82 01641 ou dans le Brevet français n° 2 461 724.

De tels dextrans sont stables et ne perdent pas leurs propriétés avec le temps.

De plus, ils présentent la propriété inattendue de présenter une activité régénératrice cellulaire et tissulaire propre, à faibles doses et plus particulièrement une activité cicatrisante.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits dextrans fonctionnalisés commencent à prendre des fonctions choisies dans le groupe qui est

constitué par le carboxyméthyle, le benzylamide et le benzylamide sulfonate.

La présente invention a également pour objet une composition stabilisée, caractérisée en ce qu'elle 5 comprend un agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire tel que défini ci-dessus associé avec au moins un FGF acide et/ou un FGF basique et/ou un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique, lequel agent est capable de restaurer partiellement ou totalement l'activité biologique 10 du/des facteurs FGF acides et/ou basiques inactivés par un stockage de longue durée ou la température.

Une telle composition présente une activité de régénération cellulaire et tissulaire, et notamment une 15 action cicatrisante, accrue par rapport aux compositions de l'Art antérieur.

Selon un mode de réalisation avantageux de la composition conforme à l'invention, celle-ci comprend de 0,1 à 1 000 µg/ml d'au moins un agent à activité régénératrice 20 cellulaire et tissulaire tel que défini ci-dessus et de 0,01 ng à 300 µg d'au moins un FGF choisi dans le groupe constitué par les FGF acides, les FGF basiques, leurs dérivés, leurs analogues et leurs fragments présentant une activité biologique.

Conformément à l'invention, les compositions stabilisées contenant l'agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire seul ou associé à au moins un FGF peuvent être associés à d'autres principes actifs et/ou à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable 30 et/ou à un support physiologiquement acceptable.

Les principes actifs associés sont choisis dans le groupe qui comprend notamment les anesthésiques locaux, les antiinfectieux, des protéines sériques et du collagène.

On peut citer notamment, comme anesthésique local, la lidocaïne, comme substances bactériostatiques,

les sels de sodium, les sels d'argent, leurs dérivés ou des sulfadiazines. On peut citer comme antibiotique, la streptomycine ; on peut citer comme protéine sérique, la sérumalbumine ou la fibronectine ; on peut citer également des collagènes solubles et de l'élastine.

Conformément à l'invention, lorsque le véhicule est de l'eau, ladite composition est en outre associée à des tampons et/ou à des sels appropriés, de manière à maintenir le mélange approximativement à un pH compris entre 6,8 et 7,4 et à une force ionique comprise par exemple entre 0,1 et 0,2 en équivalent NaCl.

De telles associations conformes à l'invention sont ci-après dénommées "composition matrice".

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle est associée à des liposomes.

De telles compositions conformes à l'invention sont ci-après dénommées composition FGF-dextrane fonctionnalisé-liposome et composition dextrane fonctionnalisé-liposome.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, le support est choisi dans le groupe qui comprend notamment les pansements et les biomatériaux.

Selon un autre mode de réalisation de la composition conforme à l'invention, celle-ci est sous forme d'aérosol, lorsque le véhicule est un gaz approprié.

La composition "matrice" est avantageusement appliquée directement en solution ou en aérosol.

Conformément à l'invention, ladite composition, notamment ladite composition "matrice" est incluse dans une forme galénique telle que pommade, crème, pâte, lotion ou imprègne un gel, notamment un gel de collagène.

Egalement conformément à l'invention, ladite composition, notamment ladite composition "matrice" est incluse et/ou imprègne un support approprié tel que pan-

segment ou biomatériaux favorisant directement ou indirectement la réparation cellulaire (par exemple, un fil de suture chirurgical ou le corail pour greffe osseuse).

Ladite composition "matrice" peut notamment 5 être incluse dans des crèmes ou lotions utilisées traditionnellement, notamment les crèmes à base de lanoline telles que "SILVEADENE", "MARIO", "AQUAPHOR", "EQUALIA", pour des applications sur la peau ; elle peut également être incluse ou imbiber des pansements tels que pansements 10 de textiles, de tissus synthétiques ou d'éponges, ou des produits naturels servant de recouvrement de plaies, par exemple des gels de collagène ou des dermes d'origine animale.

Ladite composition "matrice" conforme à 15 l'invention, doit imprégner ces différentes formes de pansements, de manière à ce que le facteur FGF et/ou le dextrane fonctionnalisé substitué puissent être en contact ou diffuser, jusqu'aux tissus cibles.

La composition conforme à l'invention est notamment 20 maintenue sur le site de la blessure et sur les blessures ouvertes, de manière à maintenir l'hydratation selon les techniques de l'homme de l'Art, particulièrement élaborées dans le domaine des greffes de peau.

Les pansements occlusifs peuvent être imprégnés 25 de la même manière, adsorbés ou recouvrir un support naturel ou synthétique.

Pour les applications sur les cornées, le véhicule doit être compatible avec la tolérance oculaire (par exemple, le produit commercialisé sous le nom de 30 "LACRIBULE"), des solutions salines, des solutions isotoniqnes (par exemple, le "NEOCADRON" (Merck-Sharp-Dohme)).

Ces véhicules peuvent contenir également des agents conservateurs comme les chlorures de benzyl-diméthyl alcoyle d'ammonium ou l'éthylène diamine tétracétate de sodium (EDTA).

Conformément à l'invention, la composition FGF-dextrane fonctionnalisé-liposome ou la composition dextrane fonctionnalisé-liposome est incluse dans une forme galénique telle que pommade, crème, pâte, lotion ou 5 imprégné un gel, notamment un gel de collagène.

Dans le cas de dextrans fonctionnalisés insolubles, ceux-ci peuvent également être inclus seuls ou associés au FGF dans des supports comme les crèmes, les gélatines ou gels de collagènes, ou sur des fibres synthétiques ou naturelles, supports habituels de pansements de recouvrement. L'inclusion des polymères fonctionnalisés insolubles peut se faire par addition de solution de collagène et gélification. Les procédures décrites dans une série de brevets de YANNAS peuvent être utilisées. 10
15 Dans ces brevets (US 4, 060081), une composition lamineuse composite donnant une peau équivalente dans laquelle la partie en contact avec la blessure est couverte de collagène réticulé avec un glycosaminoglycane, le mélange étant obtenu par addition de glycosaminoglycanes au 20 collagène solubilisé, l'ensemble étant précipité ou réticulé par du glutaraldéhyde (Brevet US 4418691).

La composition conforme à l'invention, est notamment préparée par le mélange d'au moins un FGF approprié avec au moins un agent à activité régénératrice et 25 stabilisante.

Lesdits FGFs sont obtenus par extraction et purification, à partir de sources naturelles, par synthèse chimique ou bien par des techniques de recombinaison génétique appropriées.

30 Lesdits FGFs sont d'origine humaine ou bien proviennent d'autres animaux, notamment d'autres mammifères.

De nombreux procédés de purification pour extraire et isoler les deux formes de FGFs à partir de ces 35 sources naturelles (répine, cerveau, hypophyse, placenta, rein etc...) ont été décrits dans l'Art antérieur.

Les méthodes préférées de la présente invention sont celles décrites dans Biochimie, 1986 (COURTY et al.) ou celle décrite dans la Demande de Brevet français 2 613 936, qui utilise la chromatographie d'affinité sur 5 polystyrènes substitués biospécifiques.

Ces méthodes préférées incluent une étape de traitement de l'extrait tissulaire à pH très acide, excluant ainsi tout risque de contamination virale, et l'utilisation d'une chromatographie sur héparine 10 immobilisée ou polystyrène substitué.

Les deux formes de FGF peuvent ainsi être isolées et séparées, avec les autres protéines ou individuellement avec un degré de pureté suffisant pour être débarrassé de quantités significatives d'autres matériels contaminants. 15

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comporte encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de 20 la présente invention ainsi qu'à des exemples montrant l'effet des dextrans substitués fonctionnalisés sur la protection de l'activité biologique des FGFs.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de 25 l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemples

Exemple 1 : Procédé de stabilisation des FGF.

1) Préparation d'un dextrane substitué fonctionnalisé (agent de régénération cellulaire et tissulaire). 30

35 . 30 grammes de dextrane T40 (0,185 mole) sont dissous dans 146 ml d'eau distillée et refroidis à 4°C dans un bain de glace fondante. 59,2 g de NaOH (1,48 moles) sont dissous dans 100 ml d'eau distillée, puis refroidis à 4°C. La solution de soude est versée lentement

dans la solution de dextrane sous agitation et l'ensemble est maintenu à 4°C pendant 20 minutes. On ajoute alors 61 g de ClCH₂COOH (0,647 mole) très progressivement, afin que la température atteigne 20°C après 5 minutes. Le 5 milieu réactionnel est alors porté à 40°C en 10 minutes et maintenu à cette température pendant 90 minutes, puis refroidi vers 20°C. Le pH est abaissé vers 7 avec de l'acide acétique concentré. L'ensemble est précipité dans 2 litres de méthanol, filtré et lavé deux fois avec 1 10 litre d'éthanol, puis séché sous vide à 40°C.

. 10 g du polymère modifié précédent sont dissous dans 55 ml d'eau distillée acidifiée à pH 3. 60 ml de diméthylformamide sont ajoutés très progressivement sous agitation, en maintenant le pH à la valeur de 3. La 15 température est abaissée à -15°C et 12,3 ml de N-méthylmorpholine sont ajoutés avec 14,5 ml de chloroformate d'isobutyle. On ajoute ensuite 12,2 ml de benzylamine. Après 30 minutes, le polymère est précipité dans 800 ml de méthanol filtré et séché.

20 . 9 g du polymère modifié précédent sont dispersés dans 25 ml de dichlorométhane anhydre. Un mélange de 0,26 ml de HSO₃Cl et de 2,5 ml de dichlorométhane est ajouté dans le réacteur et l'ensemble est maintenu 4 heures à température ambiante. Après filtration et lavage 25 par du dichlorométhane, le produit est séché, dissous dans 30 ml d'eau et le pH est ajusté à la valeur 7,0. La solution est ultrafiltrée contre une solution tampon, puis contre de l'eau distillée. La solution est alors lyophilisée jusqu'à obtention du polymère sec.

30 Une autre méthode de préparation d'un dextrane substitué fonctionnalisé peut être utilisée comme telle que celle décrite dans le Brevet Européen n° 0 023 854.

2) Préparation du/des FGF.

- On traite le/les extraits cellulaires pendant une nuit en présence d'acide acétique à pH 3, puis 35

on sépare les FGFs par chromatographie sur héparine immobilisée ou polystyrène substitué.

3) Préparation d'une composition stable de FGF conforme à l'invention.

5 - On prépare une solution de dextrane à partir du polymère sec obtenu en 1) en le mettant en solution dans un tampon phosphate isotonique (PBS), de manière à obtenir une concentration de 400 µg/ml.

10 - On met les FGFs extraits en 2) en solution dans ce tampon contenant les dextrans substitués appropriés, de manière à obtenir une concentration en FGFs de 100 µg/ml.

Exemple 2 : Pommade stabilisée conforme à l'invention.

15 FGF 10 µg
 DF 5 mg
 Carboxyméthyl cellulose 2,5 g
 Eau purifiée stérile apyrogène 100 ml
 DF = Dextrane fonctionnalisé de type E tel que
 20 défini dans le tableau III ci-après.

La crème obtenue peut être appliquée sur une plaie de type scarification sur un rat, et ce pendant trois jours.

Exemple 3 : Pansement stabilisé conforme à l'invention.

Le support du pansement est constitué d'un film collagène "Pangil" des Laboratoires FOURNIER, imprégné par adsorption passive d'un mélange de FGF et de Dextrane fonctionnalisé dans les proportions suivantes :

30 FGF 10 µg
 DF 500 µg
 Sérum physiologique 10 ml

Après incubation du film de collagène pendant 30 minutes à 4°C dans la solution décrite ci-dessus, on 35 obtient un pansement pouvant être utilisé dans des cas

d'ulcérations diverses, de plaies superficielles ou profondes.

Ce pansement peut être stocké sous vide et empaqueté.

5 * ETUDE DE L'EFFET DE POLYMERES BIOSPECIFIQUES
FONCTIONNALISES SUR LA PROTECTION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FGFs *in vitro*.

Méthodologie utilisée pour la mesure de l'activité biologique des FGFs *in vitro*.

10 Les méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité biologique des FGFs sont décrites dans de nombreuses publications, et sont toutes basées soit sur une mesure de l'augmentation du nombre de cellules induite par des doses croissantes de facteurs ajoutés au milieu 15 de culture des cellules, soit sur une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA des cellules stimulées par le facteur de croissance. Dans les deux méthodes évoquées, ces augmentations sont dépendantes de la dose de facteur ajoutée, et l'on peut donc 20 établir des effets dose et des courbes dose-réponse avec un effet maximal de stimulation. Par simplification, on définit une unité de stimulation comme la dose de facteur de croissance qui, ajoutée à un millilitre de milieu de culture sur des cellules cibles est capable d'induire une 25 augmentation du nombre de cellules ou de l'incorporation de thymidine tritiée correspondant à la moitié (50 %) de la valeur maximale de cette augmentation mesurée dans la courbe dose-réponse. Cette définition et la reproductibilité de ces mesures sont exposées notamment dans PLOUET 30 et al., 1984, Cellular and Molecular Biology 30, p 105.

EXEMPLE A : EFFET PROTECTEUR DU DEXTRAN SUBSTITUE CONTRE L'INACTIVATION DES FGFs ACIDE ET BASIQUE PAR DES pH ACIDES ET ALCALINS.

Dans ces expériences, les FGFs sont en solution à une concentration de 100 µg par millilitre, dans un tampon phosphate isotonique (PBS) ne contenant pas de

dextrane (témoin) ou contenant du dextrane substitué à 400 µg/ml. 10 µl de ces différentes solutions sont prélevés et mélangés soit à 1 ml de tampon PBS, d'acide acétique (CH_3COOH) dilué ajusté à pH 2 (environ 1 N), soit 5 de soude (NaOH) diluée ajustée à pH 9,0. Ces échantillons sont incubés à 20°C pendant deux heures et un prélèvement de 1 µl est effectué pour le dosage de l'activité biologique.

La figure 1 présente la courbe dose-réponse du 10 bFGF sur des fibroblastes CCL39.

Cette figure comporte en abscisse le logarithme de la concentration de bFGF en pg/ml et en ordonnée la pourcentage de stimulation.

La courbe 1 correspond au témoin ; la courbe 2 15 correspond au bFGF seul à pH 2 ; la courbe 3 correspond au bFGF en présence de dextrane à pH 2 ; la courbe 4 correspond au bFGF en présence de dextrane à pH 9 ; la courbe 5 correspond au bFGF seul à pH 9 et la courbe 6 correspond au témoin en présence de dextrane.

20 L'augmentation d'incorporation de thymidine tritiée représente la valeur du nombre de coups par minute (cpm) obtenue au plateau de la courbe dose-réponse du bFGF seul moins la valeur en cpm de thymidine tritiée incorporée dans les cellules en absence de FGF et déterminée dans la même expérience.

Les courbes 3 et 4 montrent que le bFGF en présence de dextrane conserve son pouvoir de stimulation tant en milieu acide que basique.

30 Le tableau I résume les résultats obtenus avec les FGFs acide et basique. L'unité de stimulation est arbitrairement fixée à 1 pour le aFGF ou le bFGF de départ, incubé deux heures à 20°C.

TABLEAU I

		pH 2	pH 7	pH 9
5	FGFb (0°C)		0,9	
	FGFb (2 H, 20°C)	53	1	13
	FGFb + DF (2H, 20°)	1	1	2,5
10	FGFb + H.S. (2H, 20°)	3	1	4
	FGFa (0°)		1	
	FGFa (2H, 20°)	6	1	6
15	FGFa + DF (2H, 20°)	0,5	0,4	2
	FGFa + H.S. (2H, 20°)	1,5	0,8	4,5

DF = dextrane fonctionnalisé : dans cet exemple, il s'agit du dextrane E tel que défini dans le tableau III, ci-après.

H.S. = heparane sulfate : (Société BIOVALORIS à Plouhermel (Ile-et-Villaine, FRANCE)).

Ce tableau montre l'effet protecteur du DF (Dextrane fonctionnalisé) contre l'inactivation des FGFs acide et basique induits par des pH acides et alcalins.

L'incubation du FGF basique pendant deux heures à 20°C dans une solution tampon pH 2 à 9 induit une inactivation de l'activité biologique du FGF basique.

En effet, il faut 53 fois plus de produit à pH acide et 13 fois plus à pH basique pour induire un effet biologique au produit initial. ..

L'adjonction de DF à ce mélange protège totalement l'activité biologique du FGF basique contre des incubations à pH 2 ou 9.

Des résultats similaires sont observés dans le cas du FGF acide concernant les deux types de traitement.

EXEMPLE B : EFFET DU DEXTRANE FONCTIONNALISE
(DF) SUR L'INACTIVATION DES FGFs PAR LA TEMPERATURE A
COURT TERME ET LONG TERME.

Dans cet exemple, le FGF préparé comme dans
5 l'exemple A est incubé à 4°C, 20°C, 37°C ou 60°C pendant
différents temps, en l'absence ou en présence de 400 µg
de dextrane fonctionnalisé (DF) tel que défini dans le
tableau III ci-après, puis dosé.

Les résultats sont présentés dans le tableau
10 II ci-après.

TABLEAU II

		4°C	20°C	37°C	60°C
15	bFGF t=0'	1			
	bFGF t=30'	1	1	3,5	> 100
	bFGF + DF t=30'	1	1	1	9
	aFGF t=0'	1			
	aFGF t=30'	1	1	2	> 100
	aFGF + DF t=30'	0,4	0,4	0,4	5
20	bFGF t=24 H	1	1	6	
	bFGF + DF t=24 H	1	1	1	
	aFGF	1	1	1	
	aFGF + DF	0,4	0,4	0,4	
	bFGF t=7 jours	2	5	>100	
	bFGF + DF t=7 jours	1	1	1	
25	bFGF+H.S. t=7 jours	1	2	6	
	aFGF t=7 jours	2,5	8	>100	
	aFGF + DF t=7 jours	0,4	0,4	3	

DF = dextrane fonctionnalisé

30 H.S. = héparane sulfate

L'unité de stimulation initiale est fixée
arbitrairement à une valeur égale à 1.

Dans ce tableau, on observe une forte inhibi-
tion de l'activation du FGF acide ou basique induit par
35 un traitement d'une semaine à 37°C. La présence du DF

dans le milieu d'incubation protège les deux types de FGF contre la dénaturation thermique.

Des résultats similaires sont observés en utilisant l'HS (Héparane Sulfate), équivalent biologique du DF.

EXEMPLE C : EFFET DE DIFFERENTS DEXTRANES FONCTIONNALISES SUR LES EFFETS DOSE-REPONSE DU FGF.

L'effet de différents dextrans fonctionnalisés est mesuré à l'unité sur le tableau III ci-dessous.

10

TABLEAU III

15

Dérivés dextrans	% D	% W	% X	% Y	R/us
A	100	0	0	0	1
B	0	106	0	0	1,6
C	0	84	21	0	1,7
D	10	76	0	14	2,6
E	0	89	6	5	2,36
F	0	74	16	10	3,1
G	65	30	1	4	2,54
H	29	42	24	5	2,1

Pourcentage :

20 D : Dextrane

W : Carboxyméthyle

X : Benzylamide

Y : Benzylamidesulfonate

R/us est la valeur du rapport des valeurs des unités de stimulation du aFGF sans dextrane fonctionnalisé divisé par l'unité de stimulation en présence de dextrane fonctionnalisé.

*** ETUDE DE L'EFFET DE POLYMERES BIOSPECIFIQUES FONCTIONNALISES SUR LA PROTECTION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FGFS *in vivo***

Exemple D : ETUDES CINETIQUE, PLANIMETRIQUE ET HISTOLOGIQUE DE L'EFFET CICATRISANT DE L'ASSOCIATION FGF/DEXTRANE FONCTIONNALISE.

Protocole expérimental :

Les opérations sont réalisées sur des rats Wistar mâles de 300 à 400 grammes. Chaque expérience est effectuée sur une série de 5 animaux.

Types de plaies :

5 Deux types de plaies cutanées sont effectuées sur la face dorsale des animaux, préalablement rasée.

- Les prélèvements sont effectués par punch (0,6 cm de diamètre) jusqu'au plancher musculaire.

10 - Des scarifications de 1 cm de long sont pratiquées au scalpel. Elles n'affectent pas la région dermo-épidermique.

Mode opératoire :

15 Selon le type de plaies, les blessures sont traitées par différents mélanges de produits en solution dans du sérum physiologique tamponné (pH 7,4) stérilisé.

Ces solutions sont déposées pour les plaies par punch dans un tampon collagène (GINGESTAT) pré découpé aux mesures exactes de l'excision tissulaire.

20 Dans le cas des scarifications, les produits sont déposés directement sous forme liquide sur la plaie.

25 Les effets de l'association FGF (basique ou acide ou un mélange en solution de 1 ng à 10 µg/ml) et des dextranes fonctionnalisés (en solution de 100 ng à 1 mg/ml) sont évalués et comparés à l'action d'un dextrane fonctionnalisé substitué seul et de chacun des constituants, considérés comme témoins de réaction (collagène, solution de dissolution, FGF).

30 Chaque série expérimentale d'animaux est sacrifiée à intervalle de temps défini par période de 24 heures, et les régions lésées sont prélevées pour deux types d'étude :

- une analyse morphologique externe avec planimétrie de la plaie ;

- une étude histologique.

Résultats :

I - Effets stabilisants des dextranes fonctionnalisés :

Du FGF radiomarqué à l'¹²⁵I est déposé en présence ou en absence de dextrane fonctionnalisé dans un tampon de collagène.

La variation de la radioactivité dans le collagène imprégné est appréciée en fonction du temps.

Les résultats sont illustrés dans la figure 2, qui comporte en abscisse le temps en heure et en ordonnée, le pourcentage de radioactivité. La courbe 7 correspond au FGF en présence de dextrane et la courbe 8 correspond au FGF seul.

La radioactivité est mesurée dans le gel de collagène et dans des prélèvements effectués en périphérie de la plaie, à 2 cm de celle-ci, par un punch équivalent à celui d'origine.

II - Etudes morphologique et histologique :

A) Etude morphologique :

L'observation de l'évolution des plaies à l'oeil nu permet de constater une action très nette de l'association FGF + dextrane fonctionnalisé sur la vitesse et la qualité de la cicatrisation superficielle (épidermisation + lyse du caillot).

1) Après 24 heures, les tampons de collagène imprégnés par cette association ont totalement adhéré aux parois de la plaie, et ne peuvent être prélevés que par lésions des tissus régénérés. Les expérimentations témoins ne manifestent une adhérence totale des collagènes qu'au bout de 36 à 48 heures.

2) La réépithérialisation est visible à l'oeil nu au bout du troisième jour, en présence de l'association FGF + dextrane fonctionnalisé, alors qu'une image identique sur les contrôles demande des temps d'expérimentation de 5 à 7 jours.

3) Analyse planimétrique : l'analyse planimétrique de la surface externe des plaies montre l'absence totale de rétraction des tissus en régénération.

Le taux de rétraction cicatricielle est évalué
5 en fonction du temps en considérant le rapport P/A où P
est le périmètre de la plaie et A la surface de la cicatrice.

L'ordre de grandeur de ce rapport P/A est du
type K/R où K est une constante et R le rayon de la plaie
10 originelle circulaire.

En fonction du temps, plus ce rapport est
faible et constant, plus la cicatrice conserve une
planimétrie proche de celle de la lésion d'origine. Par
conséquent, plus le rapport P/A est faible, plus le taux
15 de restructuration cicatriciel est limité. La qualité de
cicatrisation peut ainsi être reflétée par l'absence de
contraction.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la
figure 3, qui comporte en abscisse le temps en jour et en
20 ordonnée le rapport P/A. Le taux de rétraction est représenté par \square pour le témoin ; par \blacksquare pour le bFGF ; par \blacksquare pour les FGFs en présence d'héparane sulfate et par \blacksquare pour les FGFs associés aux dextrane fonctionnalisés..

Les résultats sont également présentés dans
25 les tableaux IV et V ci-après ; le tableau IV donne le
pourcentage de l'aire de cicatrisation en fonction de la
quantité de dextrane fonctionnalisé (DF) en présence ou
en l'absence de bFGF ; le tableau V donne le rapport P/A
dans les mêmes conditions.

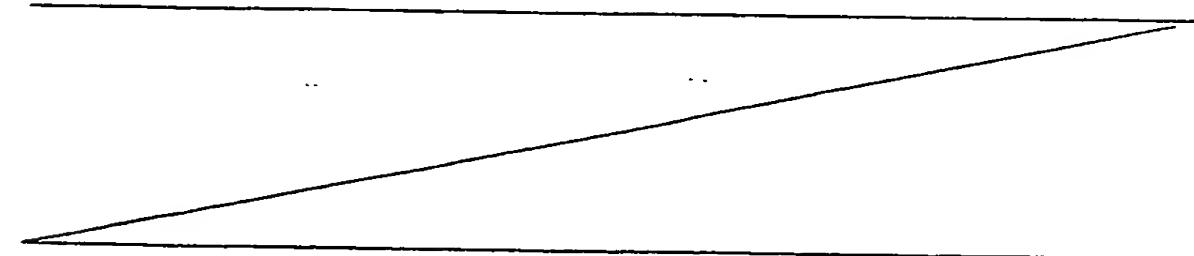


TABLEAU IV

P/A	TEMOIN	DF	DF	DF	bFGF	bFGF 1 µg + DF à différentes concentrations :		
		500 µg	50 µg	5 µg	1 µg	500	50	5
2 j	0,17	0,20	0,13	0,08	0,13	0,19	0,09	0,10
4 j	0,20	0,18	0,19	0,11	0,15	0,13	0,11	0,08
8 j	0,58	0,41	0,30	0,28	0,24	0,38	0,21	0,19

TABLEAU V

	DF	DF	DF	bFGF	bFGF 1 µg + DF à différentes concentrations :		
	500 µg	50 µg	5 µg	1 µg	500µg	50µg	5µg
2 j	125	104	173	147	112	160	128
4 j	105	213	160	169	182	231	260
8 j	280	128	145	386	329	237	253

Les effets des dextrans fonctionnalisés sur cette rétraction sont particulièrement visibles aux quatrième et huitième jours après l'opération.

Les tableaux ci-dessus montrent bien l'effet cicatrisant propre des dextrans ; en effet, dans le tableau IV, après 8 jours, le pourcentage de l'aire en présence de 5 µg de DF est proche de celui en présence de 1 µg de bFGF seul, eux-mêmes inférieurs au témoin.

La rétraction est très faible en comparaison avec celles observées dans les expérimentations témoins ou celles observées en présence des FGFs seuls ou associés à des heparanes sulfates, conditions déjà nettement plus favorables que celles du témoin.

B) Etude histologique

Les régions traitées sont prélevées, fixées, imprégnées en paraffine. L'étude histologique est réalisée sur des coupes de 7 µm. Les colorations utilisées permettent des études topographiques et histo chimiques.

L'analyse histologique montre que l'association FGF + DF accélère les étapes traditionnelles de la cicatrisation dermoépidermique et augmente la qualité des tissus reconstitués.

5 Le collagène imprégné permet une colonisation très rapide (1 jour) des catégories cellulaires environnantes (fibroblastes, musculaires lisses) à partir des tissus environnents sains, et en particulier à partir du conjonctif du plancher musculaire strié sous-jacent.

10 Dans le même temps, une néoangiogénèse permet au tissu en formation d'être colonisé par une densité très forte de capillaires sanguins. Au bout de trois jours (contre cinq à six pour les témoins), la réépithérialisation engagée à partir de l'épiderme des lèvres de 15 la plaie arrive à affrontement. Le quatrième jour, l'épiderme est totalement reconstitué et les tissus sous-jacents, totalement réorganisés, présentent une densité normale comparativement aux témoins, à la densité beaucoup plus faible. Ces mêmes illustrations révèlent 20 l'absence de rétraction des bords de la plaie pour les punchs traités par l'association FGF + dextrans fonctionnalisés, contrairement aux témoins qui comblient, par extraction, les tissus excisés.

25 Les effets de l'association des bFGF et des dextrans fonctionnalisés sur la qualité de la cicatrisation, comparés à une cicatrisation naturelle sans adjonction de produits sont présentés sur les figures 4 et 5.

30 La figure 4 présente une photographie d'une coupe histologique d'une cicatrisation témoin (absence de traitement) quatre jours après la réalisation de la plaie (X 40). La figure 5 présente la photographie d'une coupe histologique d'une cicatrisation après traitement par un tampon de collagène imprégné d'une solution de bFGF à 1 µg/ml et de dextrans fonctionnalisés à 50 µg/ml, 35 quatre jours après la réalisation de la plaie et au même grossissement de 40.

La figure 5 montre l'épiderme (E) reconstitué entièrement alors que sur la figure 4, il n'est pas reformé. Une rétraction des tissus environnants sur la plaie témoin n'est pas enregistrée sur la plaie traitée.

5 Cet espace cicatriciel, relativement anarchique en figure 4, présente pour la plaie traitée (figure 5) une organisation et une densité cellulaire satisfaisante. Il se caractérise par la présence de vaisseaux sanguins traduisant l'effet angiogénique local de l'association des

10 produits de cette invention.

Il apparaît donc que l'association bFGF + dextrane fonctionnalisé se présente comme un puissant agent cicatrisant *in vivo*, accélérant d'une part les processus naturels régénératifs, et permettant d'autre part une

15 qualité accrue de la cicatrisation par l'absence de tout phénomène de rétraction comme la mobilisation rapide des différentes catégories cellulaires nécessaires à la restauration tissulaire.

Exemple E : Etudes planimétriques et histologiques de l'effet cicatrisant de dextranes fonctionnalisés.

Le protocole expérimental, en tous points identique à celui effectué dans le cadre de l'exemple D, est réalisé pour apprécier les effets cicatrisants des

25 dextranes fonctionnalisés. Les dextranes étudiés sont répertoriés dans le tableau III de l'exemple C. Les effets cicatrisants de ces dextranes fonctionnalisés ou de leur association ont été appréciés par rapport à deux expérimentations témoins en présence de véhicule seul, de

30 tampon de collagène, ou de tampon de collagène imprégné de dextrane non substitué (produit noté A).

A - Etude morphologique

L'observation de l'évolution des plaies à l'oeil nu permet de constater une action très nette des

35 dextranes fonctionnalisés sur la vitesse et la qualité de la cicatrisation superficielle.

Par rapport aux expérimentations témoins, l'adhérence du véhicule est accélérée pour les plaies traitées par les dextrans fonctionnalisés.

La réépithérialisation suit une cinétique comparable à celle observée sous l'action des FGFs.

Le rapport P/A où P est le périmètre de la plaie et A la surface de la cicatrice traduit une diminution tout à fait significative du taux de rétraction cicatricielle. Les résultats obtenus sont illustrés par 10 le tableau VI.

Ces expérimentations confirment le rôle spécifique des dextrans fonctionnalisés sur l'inhibition de la rétraction cicatricielle et la déformation du plan cutané environnant, comme cela a déjà été spécifié ci-15 dessus à l'exemple D.

B - Etude histologique

L'analyse est identique à celle menée dans l'exemple précédent.

Elle révèle par rapport aux observations des 20 expérimentations témoins, une colonisation du collagène imprégné par les dextrans fonctionnalisés plus rapide et plus intense à partir des différents types cellulaires environnant la plaie.

La néoangiogénèse est nette mais moins soutenue que celle observée en présence des FGFs.

Les prolongements épidermiques s'affrontent aux alentours du jour 4, précédant d'au moins 24 heures la réépithérialisation observée chez les témoins.

Il apparaît donc un effet cicatrisant propre à 30 l'action des dextrans fonctionnalisés qui se manifeste par une cicatrisation aux contours harmonieux traduisant une diminution de la contraction naturelle des berges de la plaie et une mobilisation accrue et rapide de cellules colonisatrices des collagènes aboutissant à un tissu de 35 régénération plus dense et vascularisé que celui observé pour les expérimentations témoins. Un tel effet pourrait

26

peut-être s'expliquer par le fait que les dextrans fonctionnalisés substitués potentialisent, au niveau des tissus, l'action des FGFs secrétés *in situ* par les tissus environnants.

5

TABLEAU VI

Les taux de rétraction P/A sont présentés pour les témoins collagènes seuls, collagène imprégné de dextrane de type A et pour les différents dextrans répertoriés précédemment. Toutes ces molécules agissent à une 10 dilution de 3 µg/ml.

	P/A	2 j	4 j	8 j
15	T(1)	0,21	0,20	0,61
	T(2)	0,20	0,25	0,55
	B	0,16	0,18	0,30
	C	0,15	0,18	0,26
	D	0,13	0,13	0,20
	E	0,14	0,16	0,22
	F	0,10	0,11	0,20
	G	0,15	0,18	0,29
	H	0,13	0,14	0,30
	A+D	0,18	0,20	0,28
20	D+H	0,11	0,15	0,22

(1) : Collagène

(2) : Collagène + A

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartier du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire, caractérisé en ce qu'il est constitué par au moins un dextrane substitué fonctionnalisé.

5 2°) Agent selon la revendication 1, caractérisé en ce que les dextrans substitués fonctionnalisés sont choisis dans le groupe qui comprend des dextrans solubles et des dextrans insolubles.

10 3°) Agent selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdits dextrans fonctionnalisés comprennent des fonctions choisies dans le groupe qui est constitué par le carboxyméthyle, le benzylamide et le benzylamide sulfonate.

15 4°) Composition stabilisée, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 associé avec au moins un FGF acide et/ou un FGF basique et/ou un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique, 20 lequel agent est capable de restaurer partiellement ou totalement l'activité biologique du/des facteurs FGF acides et/ou basiques inactivés par un stockage de longue durée ou la température.

25 5°) Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que celle-ci comprend de 0,1 à 1 000 µg/ml d'au moins un agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire tel que défini ci-dessus et de 0,01 ng à 300 µg d'au moins un FGF choisi dans le groupe constitué par les FGF acides, les FGF basiques, leurs 30 dérivés, leurs analogues et leurs fragments présentant une activité biologique.

35 6°) Composition contenant un agent à activité régénératrice cellulaire et tissulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou une composition contenant ledit agent associé à un FGF telle que définie dans la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisée en

ce qu'elle comprend, de plus, d'autres principes actifs associés.

7*) Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que les principes actifs associés sont choisis dans le groupe qui comprend notamment les anesthésiques locaux, les antiinfectieux, des protéines sériques et du collagène.

8*) Composition selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié et/ou un support physiologiquement acceptable.

9*) Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que le véhicule est de l'eau et en ce que ladite composition comprend, en outre, des tampons et/ou des sels, de manière à maintenir le mélange approximativement à un pH compris entre 6,8 et 7,4 et à une force ionique comprise entre 0,1 et 0,2 en équivalent NaCl.

10*) Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle est incorporée à des liposomes appropriés.

11*) Composition selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que le support est choisi dans le groupe qui comprend notamment les pansements et les biomatériaux.

12*) Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'aérosol, lorsque le véhicule est un gaz approprié.

13*) Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est incluse dans une forme galénique telle que pommade, crème, pâte, lotion ou imprègne un gel, notamment un gel de collagène.

14*) Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est in-

cluse et/ou imprègne un support approprié tel que pansement ou biomatériau favorisant directement ou indirectement la réparation cellulaire.

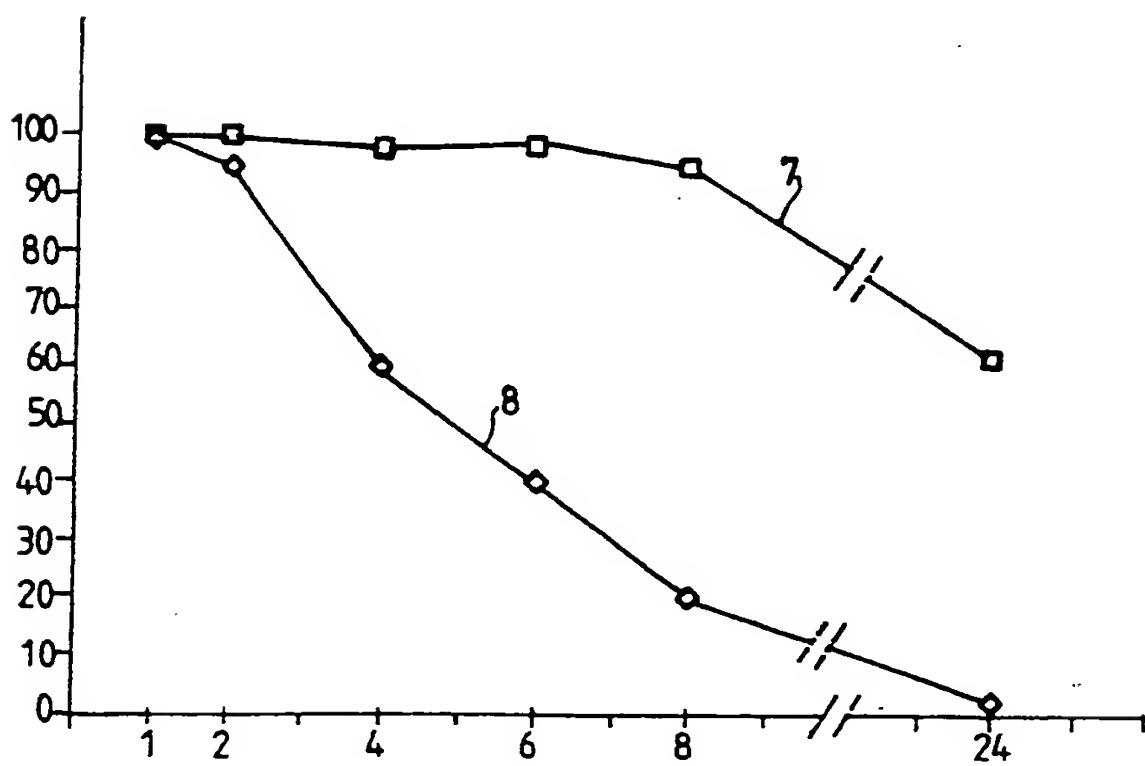
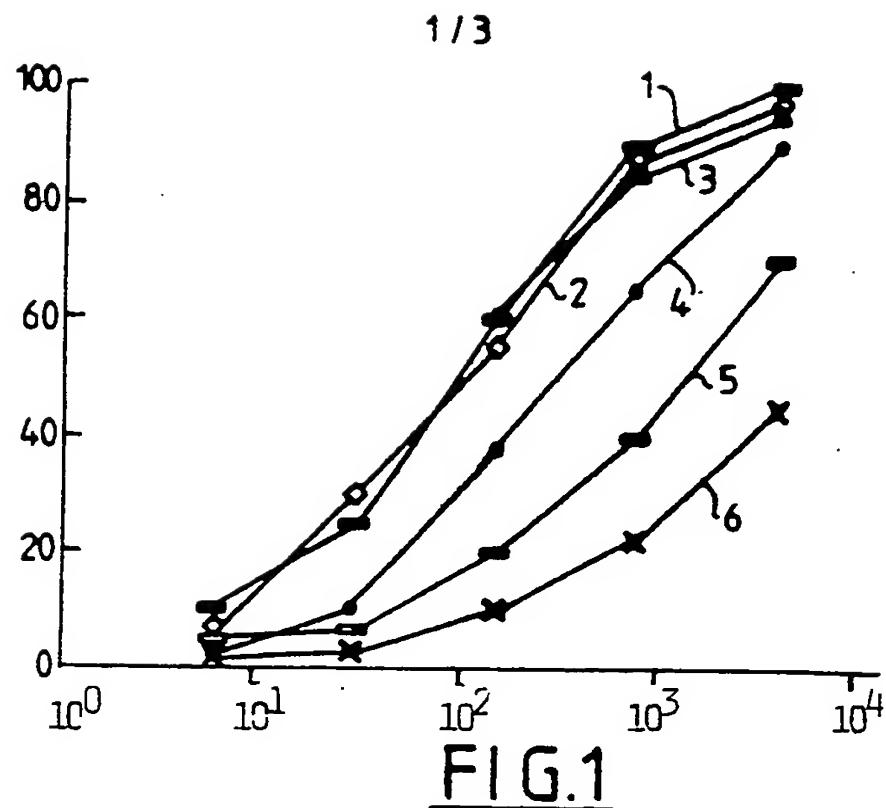


FIG.2

2/3

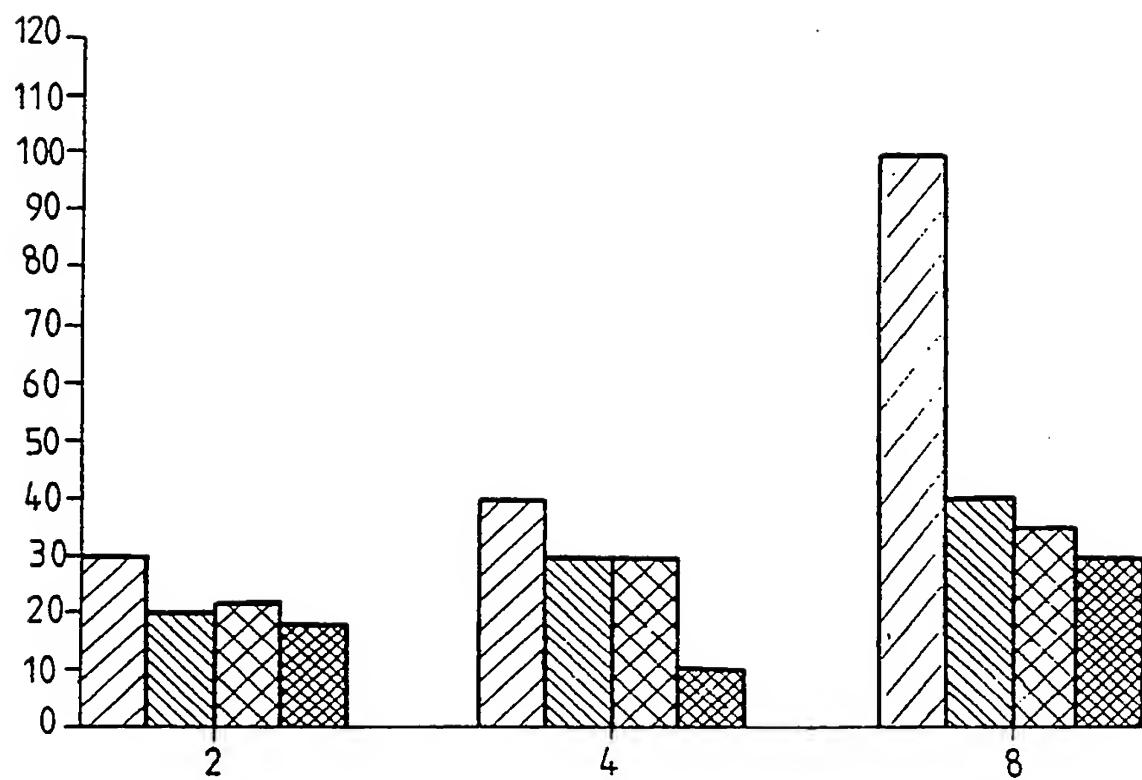


FIG.3

FIG. 4



FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00164

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. ⁵ A 61 K 37/02, A 61 K 47/36

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	A 61 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A, 0267015 (ETHICON) 11 May 1988 see claims 1-4, 7-10; page 3, lines 27-33, 36-38, 56-58; page 4, lines 7-14, 20-24, 38-42 cited in the application	4-11, 13, 14

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

18 June 1990 (18.06.90)

Date of Mailing of this International Search Report

16 July 1990 (16.07.90)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9000164
SA 35419

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 03/07/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0267015	11-05-88	US-A- 4717717 AU-A- 8064187 JP-A- 63152324	05-01-88 12-05-88 24-06-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00164

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous)¹

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CI= 5 A 61 K 37/02, A 61 K 47/36

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée²

Système de classification	Symboles de classification
5 CIB	A 61 K
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ³	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁴	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	<p>EP, A, 0267015 (ETHICON) 11 mai 1988 voir revendications 1-4, 7-10; page 3, lignes 27-33, 36-38, 56-58; page 4, lignes 7-14, 20-24, 38-42 cité dans la demande</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	4-11, 13, 14

* Catégories spéciales de documents cités:¹¹

- «A» document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- «E» document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- «L» document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- «O» document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- «P» document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- «T» document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constitutif la base de l'invention
- «X» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- «Y» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- «&» document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 juin 1990

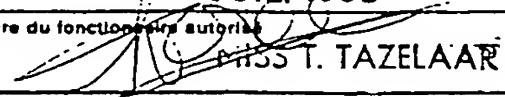
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16 JUIL 1990

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé


T. TAZELAAR

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9000164
SA 35419

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 03/07/90

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0267015	11-05-88	US-A- 4717717 AU-A- 8064187 JP-A- 63152324	05-01-88 12-05-88 24-06-88